

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19710195
 研究課題名 (和文) ホスファターゼプロファイリングを志向した新規共有結合型阻害剤の創製
 研究課題名 (英文) Development of a novel type of irreversible inhibitors
 for comprehensive analysis of protein phosphatase in cells
 研究代表者
 平井 剛 (HIRAI GO)
 独立行政法人理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室・研究員
 研究者番号：50359551

研究成果の概要：細胞内のタンパク質脱リン酸化酵素（プロテインホスファターゼ）の機能を停止させる新しいタイプの阻害剤を創製した。この阻害剤はプロテインホスファターゼと共有結合で連結する不可逆的阻害剤として設計し、実際にがん細胞の細胞周期を調節するホスファターゼ Cdc25A と共有結合を形成することを見出した。また細胞内でこの阻害剤が相互作用するタンパク質を、蛍光ラベル体を用いて検出することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プロテインホスファターゼ、有機合成、不可逆的阻害剤、蛍光ラベル体、分子プローブ

1. 研究開始当初の背景

プロテインホスファターゼは、リン酸化タンパク質からリン酸基を取り去る酵素であり、生体内には百数十種類存在すると考えられている。リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）とは逆の反応を司っており、細胞の増殖やシグナル伝達機構に深く関わっているが、詳細な機能解明はまだ十分とはいえず、効果的で選択的なホスファターゼ阻害剤の開発が求められている。

ホスファターゼはリン酸化セリン、スレオニンを脱リン酸化する PP、リン酸化チロシン

を脱リン酸化する PTP、その両方の性質を有する DSP に大別できる。中でも PTP は種類が多く、また PTP と DSP は活性中心のアミノ酸配列相同性、反応機構、立体構造が似通っているため、特定の酵素特異的な阻害剤を創製することは困難な課題である。その一方で PTP と DSP は、がんや糖尿病などの疾病に関わっていることが知られており、特異的阻害剤の創製は医薬品リード化合物となりうる重要な課題である。これまでに、天然物をはじめ合成ライブラリーから様々なホスファターゼ阻害剤は見出されている。しかし種類の多い PTP や DSP の場合、すべての酵素に対

する阻害活性を調べるのは研究室レベルでは到底困難であり、これまでに見出されてきたホスファターゼ阻害剤もこの「選択性」に関する議論は十分でないと言える。また、試験管レベルでの阻害活性は細胞内での活性を反映しているとは言えず、細胞内での阻害剤の真の挙動を追跡することが、これからの阻害剤開発の重要な課題であると考えられている。

一方、われわれはこれまでに、DSP や癌の転移・浸潤に関わっているヘパラーゼの阻害剤として単離されていた天然物 RK-682 (1) を基盤とし、ヘパラーゼを阻害せず、DSP の一種である VHR や Cdc25 類を阻害する RE 誘導体 (2) の創製に成功している。また 1 は細胞膜透過性に問題があったが、2 は HL60 細胞に対する増殖抑制効果を示すことも見出している。

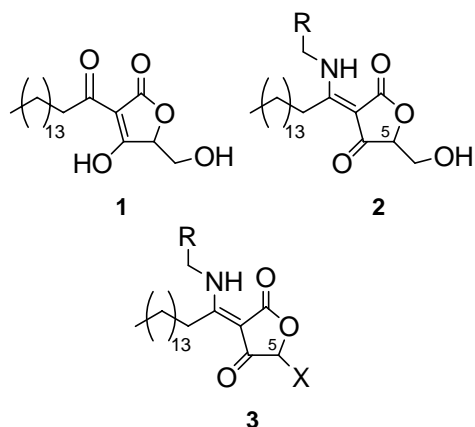


Fig.1 RE誘導体の構造

2. 研究の目的

当研究室で開発した RE 誘導体 (2) を DSP や PTP と直接共有結合を形成するタイプの阻害剤へと改変し、それを蛍光プローブ化して“細胞内のホスファターゼプロファイリング”へと展開することを本研究の最終目的とした。細胞内での 2 の標的酵素群を同定するためには、2 と標的酵素とが共有結合を形成しなければならない。そこで、2 を基盤として新たに不可逆的なホスファターゼ阻害剤を開発することを最初の課題とした。さらに開発した不可逆的なホスファターゼ阻害剤を蛍光ラベル基で修飾した分子プローブを合成し、その細胞内タンパク質ラベル化を次の課題とした。

3. 研究の方法

まず、DSP の一種である VHR と 2 の複合体を計算化学的手法により構築した。DSP や PTP はその活性中心にシステイン残基を有し、脱

リン酸化する際は、このシステイン残基のチオール基が基質のリン酸基を求核攻撃する。したがって、通常チオール基よりもホスファターゼ活性中心は pKa が低く、活性化されている状態にある。構築したモデルによると、RE 誘導体 2 の 5 位 OH 基が活性中心のシステインである Cys124 と水素結合を形成していることが示唆された。このことから、この OH 基を脱離基等に置き換えることで、システインのチオール基から求核攻撃を受け、共有結合を形成できると考えた。

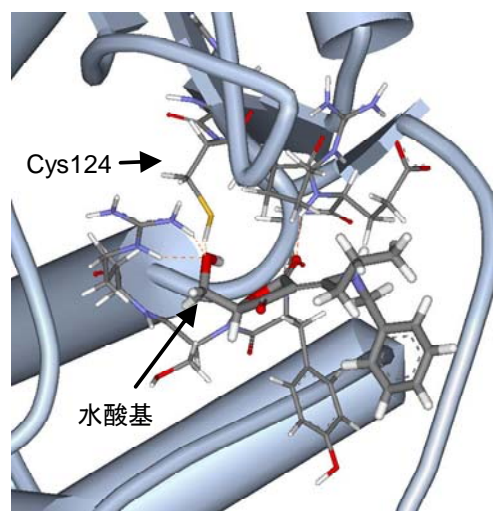
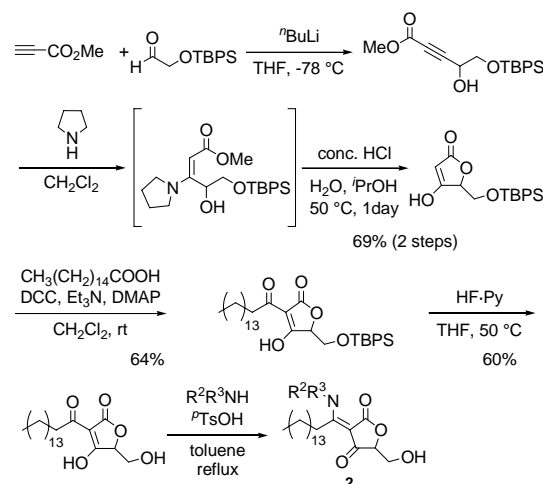


Fig.2 VHR と 2 の複合体モデル

そこでまず、効率的な RE 誘導体 2 の合成法の確立から着手した。種々検討した結果、以下の示すように短段階かつ高効率な合成法を開発した。



Scheme1. 2 の効率的合成法

次に、脱離基の導入によるホスファターゼ阻害活性への影響を調べることにした。具体的には、化合物 3 の X の部分に様々な脱離性を有する官能基を導入した化合物を合成し

た。種々の誘導体 **3** を合成し (R = Ph)、DSP に対する阻害活性を検討したところ、VHR に対しては低下したものの、Cdc25 類に対しては OH 体と比べて顕著な阻害活性の向上が見られた。また、ヒト白血病細胞 HL60 に対する細胞増殖抑制活性を検討したところ、脱離基を有する **3** が顕著な細胞増殖抑制活性を示すことが分かった。

IC ₅₀ s	X = (R = Ph)		
	2	3a	3b
Inhibition of Cdc25A	18.6 μM	7.3 μM	2.1 μM
Cdc25B	> 30 μM	9.6 μM	2.2 μM
HL60 Growth Inhibition	toxic	3~4 μM	1.7 μM

IC ₅₀ s	X = (R = Ph)	
	3c	3d
Inhibition of Cdc25A	2.5 μM	2.6 μM
Cdc25B	7.0 μM	5.1 μM
HL60 Growth Inhibition	1.5 μM	1.7 μM

Fig. 3 RE 誘導体の Cdc25A と Cdc25B に対する阻害活性と HL60 増殖抑制活性

さらに化合物 **3b** において細胞周期に対する影響を HL60 細胞で検討した。その結果、細胞周期を **3b** は G₁ 基で停止させ、細胞増殖を抑制していることが示唆された。

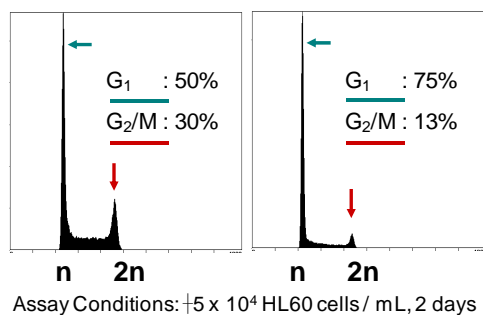


Fig. 4 HL60 細胞の細胞周期に対する **3b** の効果 (左 : Control、右 : **3b** ($3 \cdot M$) で処理後)

次に脱離基を有する RE 誘導体 **3** がホスファターゼに対して不可逆的阻害剤となっているかを確認するため、**3b** と **3a** に蛍光団を導入した **4**、**5** を合成した。GST-Cdc25A と **4** を混合し SDS-PAGE 後、蛍光スキャナーで検出すると、**4** の濃度依存的に GST-Cdc25A のバンドが濃くなることがわかり、確かに RE 誘導体は GST-Cdc25A と共有結合を形成することがわかった。また Cdc25A の活性中心に存在するシステイン残基の変異体 (C430S) を作成したところ、**5** の結合はまったく観測できなかった。このことは、RE 誘導体がホスファターゼ活性中心のシステインに結合して

いることを強く示唆している (Figure 6)。さらに、**5** でも同様の現象を確認したが、GST-Cdc25A だけでなく GST 単独にも結合することがわかった。GST も活性なシステイン残基を有していることから、**5** はエノン構造のため反応性が高く、非特異的に GST と結合している可能性があった。一方 **4** は、GST 単独には結合しないことから、タンパク質構造を認識し選択的に Cdc25A に結合していることが示唆された (Figure 7)。

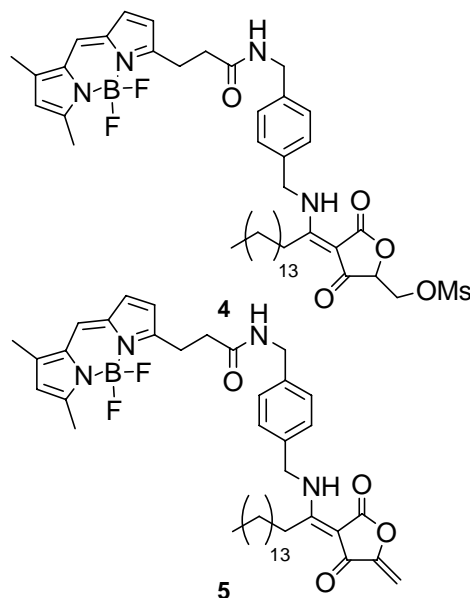


Fig.5 蛍光ラベル体の構造

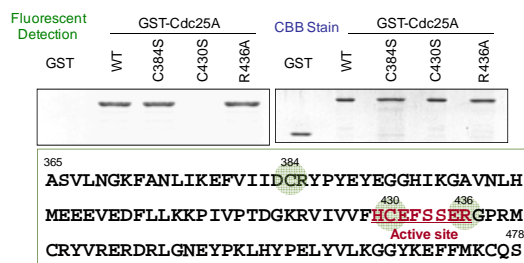


Fig.6 Cdc25A の Catalytic domain と蛍光ラベル体 **4** との結合実験

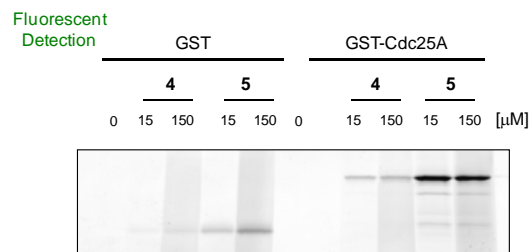
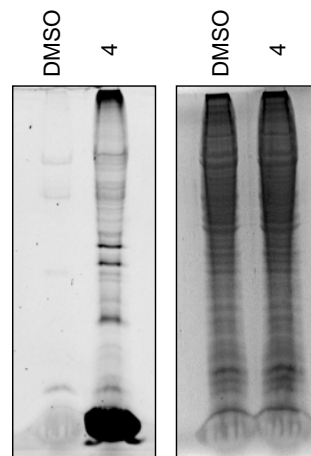


Fig.7 GST と Cdc25A の Catalytic domain の蛍光ラベル体 **4**、**5** との結合実験



次に HL60 細胞と **4** を処理し、細胞内のタンパク質と共有結合を形成するかを検討した。HL60 細胞に対し **4** (final 5 · M) を加え、4 h 後に蛍光顕微鏡で観察した。この段階で **4** はほとんど細胞内に取り込まれており核周辺の細胞質側に主に局在していることがわかった。また **4** で処理した細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で解析したところ、いくつかのタンパク質が **4** と共有結合を形成していることがわかった。この時、細胞内で多く発現しているタンパク質がラベル化されているわけではないことがわかり、細胞内でのタンパク質ラベル化が RE 化合物選択的である可能性が示唆された。

Fig. 8 蛍光ラベル体 **4** の HL60 細胞内でのタンパク質ラベル化

4. 研究成果

- (1) 新規 DSP 阻害剤 RE 誘導体の効率的合成法を確立した。
- (2) DSP の 1 種である Cdc25A に対する不可逆的阻害剤の開発に成功した。
- (3) 開発した不可逆的阻害剤を蛍光ラベル化した分子プローブを創製した。このプローブは、HL60 細胞内でその標的タンパク質と共有結合を形成することを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Keiko Hata, Koichi Koseki, Kazunori Yamaguchi, Setsuko Moriya, Yasuo Suzuki, Sangchai Yingsakmongkon, Go Hirai, Mikiko Sodeoka, Mark von Itzstein, and Taeko Miyagi

Limited Inhibitory Effects of Oseltamivir and Zanamivir on Human Sialidases
Antimicrob. Agents Chemother.、査読有、52、2008、3484-3491

(2) Toru Watanabe, Go Hirai, Marie Kato, Daisuke Hashizume, Taeko Miyagi, and Mikiko Sodeoka

Synthesis of CH_2 -Linked (2,3)-Sialylgalactose Analogue: On the Stereoselectivity of the Key Ireland-Claisen Rearrangement
Org. Lett.、査読有、10、2008、4167-4170

(3) Go Hirai, Toru Watanabe, Kazunori Yamaguchi, Taeko Miyagi, and Mikiko Sodeoka

Stereocontrolled and Convergent Entry to CF_2 -Sialosides: Synthesis of CF_2 -Linked Ganglioside GM4

J. Am. Chem. Soc.、査読有、129、2007、15420-15421

(4) Go Hirai, Tadashi Shimizu, Toru Watanabe, Yosuke Ogoshi, Megumi Ohkubo, and Mikiko Sodeoka

Importance of interaction between C1 domain and lipids in protein kinase Ca activation: Hydrophobic side chain direction in isobenzofuranone ligands controls enzyme activation level.

ChemMedChem、査読有、2、2007、1006-1009

[学会発表] (計 7 件)

(1) 平井剛、細胞内ホスファターゼ解析を志向した不可逆的阻害剤の開発、平成 19 年度「若手研究者のためのセミナー」、2007. 10. 27、慶応大学

(2) 土屋綾子、RE 誘導体をプローブとしたホスファターゼ網羅的解析法の開発、日本薬学会第 128 年会、2008. 3. 26-28、横浜

(3) 平井剛、RK-682 エナミド誘導体標的酵素の網羅的解析法の開発、日本化学会第 88 春季年会、2008. 3. 26-30、東京

(4) 平井剛、RK-682 エナミド誘導体標的酵素の網羅的解析法の開発、日本ケミカルバイオロジー研究会第三回年会、2008. 5-19-20、東京

(5) Go Hirai、Development of RK-682 enamide derivatives and attempts at comprehensive analysis of their target proteins in cells、THE 22nd NAITO CONFERENCE ON Chemical Biology [I]、2008. 9. 9-12、札幌

(6) Go Hirai、Development of Dual-specificity Protein Phosphatase Inhibitor、The First RIKEN Chemical

- Biology Department International
Symposium、2008.9.25-26、熱海
- (7) 土屋綾子、ホスファターゼの網羅的
解析法を志向した分子プローブの創
製と評価、日本薬学会第 129 年会、
2009.3.26-28、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者 平井 剛 (HIRAI GO)
独立行政法人理化学研究所 袖岡有機合成
化学研究室 研究員

研究者番号 : 50359551